

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para saneamiento de
“virus de la tristeza de cítricos” (CTV) en *Tangelo minneola*
“tangelo” y *Citrus limon* variedad *eureka* “limón”

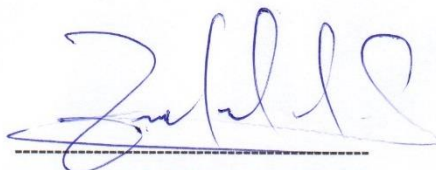
TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO

Br. TIRABANTE TERRONES NERY

PIURA – PERÚ

2018



Br. NERY TIRABANTE TERRONES
EJECUTOR



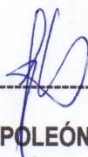
Mclgo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ
ASESOR



DR. ROBERTO MENDOZA RENDÓN
PRESIDENTE



Dr. JESÚS MANUEL CHARCAPE RAVELO
SECRETARIO



Mclgo. JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE
VOCAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS



ACTA DE SUSTENTACIÓN 004-2018-D-FC-UNP

FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **MICROINJERTO DE APICES CAULINARES IN VITRO PARA SEAMIENTO DE "VIRUS DE LA TRISTEZA DE CÍTRICOS" (CTV) EN TANGELO MINNEOLA "TANGELO" Y CITRUS LIMÓN VARIEDAD EUREKA "LIMÓN"** presentada por la señorita Bachiller **NERY TIRABANTE TERRONES**, con el asesoramiento del **McBlgo. César Augusto Torres Díaz**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

APROBADA ☒

DESAPROBADA ☐

Con la mención de:


BUENO

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

☒ En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que el sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 10 de enero 2018.


Dr. ROBERTO MENDOZA RENDÓN
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS


Dr. JESÚS MANUEL CHARCAPE RAVELO
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS




McBlgo. JAIME NAPOLEÓN FERNÁNDEZ PONCE, M.Sc.
VOCAL DE JURADO DE TESIS

Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla
PIURA - PERU

DEDICATORIA

A Dios.

Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi madre Liboria.

Por haberme apoyado en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi padre Vicente.

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

A mis hermanos.

A mi hermana Olga por su apoyo en momentos difíciles; a mi hermano Antero, Renner y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

Finalmente, a los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de nuestro camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al Mtblgo. Cesar Torres Díaz, asesor principal, por su valiosa colaboración.

A la Blga. Rosa Cabrera Pintado, Co-asesora, por su incondicional apoyo en el desarrollo del proyecto, por sus muestras de afecto y comprensión por que con sus enseñanzas de Biotecnología vegetal hizo posible realizar esta investigación.

A todos mis compañeros de proyecto y muy en especial a la técnica de laboratorio Luz Guzmán Quispe por su apoyo en el laboratorio de la subdirección de biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), por compartir sus experiencias y conocimientos.

A la Asociación de Productores de Cítricos del Perú (Procitrus) por el financiamiento del proyecto.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pág.
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
2.1 Localización del estudio.	7
2.2 Zona de recolección de muestras de material vegetal (varetas).....	7
2.3 Material vegetal experimental.....	7
2.3.1 Semillas certificadas	7
2.3.2 Varetas	7
2.4 Métodos	7
2.4.1 Germinación aséptica del patrón.	7
2.4.2 Preparación del injerto.....	9
2.4.2.1 Acondicionamiento de varetas.	9
2.4.2.2 Introducción <i>in vitro</i> de varetas.....	9
2.4.3 Microinjertación.	10
2.4.4 Sobreinjerto.	13
2.4.5 Diagnóstico molecular del virus de la tristeza de cítricos (CTV).....	13
2.4.6 Procesamiento de datos	15
III. RESULTADOS	16
3.1 Resultados de presencia y ausencia de virus de la tristeza de cítricos (CTV).	16
3.2 Resultados de prendimiento de los microinjertos de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo”	16
3.3 Resultados de prendimiento de los microinjertos de <i>Citrus limon</i> variedad <i>eureka</i> “limón”.	16

3.4	Resultados de prendimiento de los sobreinjertos en invernadero.....	16
IV.	DISCUSIÓN	18
V.	CONCLUSIONES	21
VI.	RECOMENDACIONES.....	22
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	23
VIII.	ANEXOS	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Preparación de semillas. A) Semilla de *Citrango troyer* salidas de cuarentena, B) semilla de *Citrango troyer* con los tegumentos eliminados, C) Semillas de *Citrango troyer* desinfectadas, aptas para ser sembradas 8

Figura 2. Germinación de semillas. A) Semilla de *Citrango troyer* sembrada, B) plántula resultante de 2 semanas de cultivo. 8

Figura 3. Brotes cultivados *in vitro*. A) Vareta cultivada *in vitro* con brotes de 3 semanas, B) Brote cultivado *in vitro* mostrando su tamaño ideal para microinjertación. 10

Figura 4. Material vegetal para la microinjertación. A) Patrón *Citrango troyer* B) Brote como fuente de ápice caulinar de *Citrus limon* variedad *eureka* “limón”..... 11

Figura 5. Disección del ápice caulinar. A) a) meristemo de 7 primordios foliares, b) meristemo de 6 primordios foliares, c) meristemo de 5 primordios foliares, d) meristemo de 4 primordios foliares. B) 1,2 y 3 meristemo de 4 primordios foliares en diferentes aumentos, C) I, II y III meristemo diseccionado de 2 primordios foliares, D) Microinjerto de ápice caulinar de *Citrus limon* var. *eureka* sobre el patrón *Citrango troyer* en medio liquido MS suplementado con vitaminas de White. 12

Figura 6. Muestras de *Tangelo minneola* “tangelo” y *Citrus limon* variedad *eureka* llevado al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) para el diagnóstico de virus de la tristeza de los cítricos (CTV)..... 14

Figura 7. Etapas de desarrollo del microinjerto de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón”. A) Microinjerto de 8-10 días, B) Microinjerto de 4 semanas, C) Microinjerto de 8 semanas. 17	17
Figura 8. Etapas de desarrollo del microinjerto de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo”. A) Microinjerto de 8-10 días, B) Microinjerto de 2 semanas, C) Microinjerto de 4 semanas . 17	17
Figura 9. Informe de la prueba molecular RT-PCR para el virus de la tristeza de cítricos de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo” emitido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)..... 34	34
Figura 10. Informe de la prueba molecular RT-PCR para el virus de la tristeza de cítricos de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón” emitido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)..... 35	35
Figura 11. Informe de la prueba molecular RT-PCR para el virus de la tristeza de cítricos de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón” emitido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)..... 36	36
Figura 12. Microinjertos no prendidos. A) Microinjerto no prendido de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón” del tratamiento (75 g/l de sacarosa y 2 cotiledones), B) Microinjerto no prendido de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo” del tratamiento (75 g/l de sacarosa y 2 cotiledones). 37	37
Figura 13. Esquema de la técnica de microinjerto de ápices caulinares <i>in vitro</i> (MAC)... 38	38
Figura 14. Siembra de patrón <i>Citrus jambhiri</i> “limón rugoso” 39	39
Figura 15. Esquema del procedimiento de sobreinjerto 40	40
Figura 16. Recolección de varetas de los campos de la Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral. 41	41
Figura 17. Campos citrícolas de la Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral. 41	41
Figura 18. Acondicionamiento de varetas en el ambiente de recepción de muestra del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)..... 42	42

Figura 19. Invernadero establecido para el proyecto: Establecimiento de bloques fundación de material de propagación de cítricos libres de virus, viroides y HBL, mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas de saneamiento con fines de implementación de un programa nacional de certificación de cítricos liderado por PROCITRUS en asociación con el INIA.
 43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la solución de sales minerales de Murashige y Skoog (1962)... 28

Tabla 2. Vitaminas de White (Navarro *et al*, 1975). 28

Tabla 3. Datos de prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo” 29

Tabla 4. Datos de prendimiento de los microinjertos de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”.
 29

Tabla 5. Datos de prendimiento de los microinjertos y sobreinjertos. 30

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis de varianza de los datos de prendimiento de los microinjertos de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo”	30
Cuadro 2. Comparación de medias del prendimiento de los microinjertos de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo”.....	30
Cuadro 3. Prueba de normalidad de datos Shapiro-Wilks	31
Cuadro 4. Prueba de Levene para el factor concentración de sacarosa de los datos de prendimiento de los microinjertos de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo”	31
Cuadro 5. Prueba de Levene para el factor número de cotiledones de los datos de prendimiento de los microinjertos de <i>Tangelo minneola</i> “tangelo”	31
Cuadro 6. Análisis de varianza del prendimiento de los microinjertos de <i>Citrus limón</i> variedad <i>eureka</i>	32
Cuadro 7. Comparación de medias de prendimiento de los microinjerto de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón”.	32
Cuadro 8. Prueba de normalidad de datos Shapiro-Wilks	32
Cuadro 9. Prueba de Levene para el factor concentración de sacarosa de los datos de prendimiento de los microinjertos de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón”	33
Cuadro 10. Prueba de Levene para el factor número de cotiledones de los datos de prendimiento de los microinjertos de <i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i>	33

RESUMEN

Como una alternativa de producir frutales de alta calidad fitosanitaria en el Perú, en la subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) se evaluó la influencia de la microinjertación de ápices caulinares *in vitro* para el saneamiento del “virus de la tristeza de cítricos” (CTV) en las variedades *Tangelo minneola* “tangelo” y *Citrus limon* var. *eureka* “limón”, el efecto de la concentración de sacarosa sobre el desarrollo de los microinjertos y el efecto del número óptimo de cotiledones en el patrón sobre el desarrollo de los microinjertos. El microinjerto fue realizado utilizando brotes de varetas que fueron sometidas a termoterapia, e injertados en el patrón *Citrango Troyer* de dos semanas de edad, al patrón se eliminó o dejó el número de cotiledones según el tratamiento (0c,1c,2c). Las plantas microinjertadas fueron cultivadas en medio MS líquido de Murashige & Skoog adicionado Vitaminas de White y con concentraciones de sacarosa de 30 gr/l y 75 gr/l, luego del desarrollo, las plantas microinjertadas fueron sobreinjertadas en plantas de *Citrus jambhiri* “limón rugoso”. Se usaron hojas de las plantas sobreinjertadas y desarrolladas en invernadero para el diagnóstico del virus de la tristeza de cítricos (CTV) mediante la técnica RT-PCR. Los resultados de las pruebas moleculares RT-PCR demostraron que las plantas obtenidas se encontraban libres de virus, comprobando la influencia de la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* en el saneamiento de virus de la tristeza de cítricos (CTV). El prendimiento de *Tangelo minneola* “tangelo” fue de 7.7 % y de *Citrus limon* var. *eureka* “limón” 7.2 %. El análisis estadístico aplicado a los datos de prendimiento de los microinjertos reflejó un p-valor mayor a 0.05 resultando en ambos casos ser no significativo el efecto de la concentración de sacarosa y número de cotiledones.

Palabras clave: Patrón, injerto, plantas libres de virus, concentración de sacarosa

ABSTRACT

As an alternative to produce high quality phytosanitary fruit trees in Perú, in the sub-directorate of Biotechnology of the National Institute of Agrarian Innovation (INIA) the influence of the micrografting of apices caulinar *in vitro* was evaluated for the sanitation of the "Citrus tristeza virus" (CTV) in the varieties *Tangelo minneola* and *Citrus limon* variety *eureka*, the effect of sucrose concentration on the development of micrografts and the effect of the optimal number of cotyledons on the pattern on the development of micrografts. The micrografting was performed using shoots of varetas that were subjected to thermotherapy, and grafted into the two-week-old *Citrango Troyer* pattern, the pattern was removed or left the number of cotyledons according to the treatment (0c, 1c, 2c). The micrografted plants were cultivated in liquid MS medium of Murashige & Skoog added of White Vitamins and with sucrose concentrations of 30 gr / l and 75 gr / l, after development, the micrografted plants were over-grafted on *Citrus jambhiri* plants "lemon rugose". Leaves of the plants over-grafted and developed in a greenhouse were used for the diagnosis of citrus tristeza virus (CTV) using the RT-PCR technique. The results of the molecular tests RT-PCR showed that the plants obtained were free of viruses, checking the influence of the micrograft technique of apices caulinar *in vitro* for sanitation the Citrus tristeza virus (CTV). The development of the micrografts of *Tangelo minneola* was 7.7% and *Citrus limon* variety *eureka* 7.2%. The statistical analysis applied to the development data of the micrografts reflected a p-value greater than 0.05, resulting in both cases being not significant the effect of sucrose concentration and number of cotyledons.

Key words: Pattern, graft, virus free plants, sucrose concentration

INTRODUCCIÓN

La producción de cítricos está muy extendida a nivel mundial; la cosecha de cítricos se da en los principales países que representan la producción mundial. China, Región del Mediterráneo, Estados Unidos y España lideran la producción mundial como lo han hecho durante varias décadas, siendo la producción de estos países, China con 29,5 millones de toneladas, Región del Mediterráneo con 24 millones, Estados Unidos con 9 millones y España con 6,5 millones (FAO, 2013).

El Perú cuenta con cerca de 70,000 has de plantación de cítricos, liderando dicha producción la *Citrus sinensis* “naranja” (25,000 has), seguida de *Citrus aurantifolia* “limón” (20,000 has), *Citrus reticulata* “mandarina” (15,000 has), *Citrus tangelo* “tangelo” (5,000 has) y por último *Citrus paradisi* “toronja”, *Citrus limetta* “limón dulce” y otros híbridos de naranja y mandarina que completan las 70,000 has (Del Castillo, 2013).

En el 2015 las exportaciones peruanas de *Citrus aurantifolia* “limón” fueron 7.000 toneladas, naranjas 6.6 mil toneladas (FAO, 2015). En el 2016 las exportaciones peruanas de limón fueron de 4.7 mil toneladas y naranjas de 10.3 mil toneladas (FAO, 2016)

La enfermedad del virus de la tristeza ha sido considerada como la virosis más importante y devastadora de la citricultura a escala mundial (Bar-Joseph *et al.* 1989; Cambra & Moreno, 2000). Es muy posible que sea originaria de Asia como los cítricos, y desde ahí se haya dispersado prácticamente a la totalidad de las zonas citrícolas del mundo a través del intercambio de material de propagación. Probablemente en el siglo XVII se extendió a Sudáfrica, luego a Australia, al área de Sydney en la segunda mitad del siglo XIX, y posteriormente en el siglo XX a América (Broadbent *et al.*, 1996; Cambra & Moreno, 2000).

Uno de los aspectos que influyó considerablemente en el desarrollo de esta enfermedad, fue la previa destrucción masiva por parte de *Phytophthora sp* de árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) formados de semilla, lo que se tradujo en el uso masivo del portainjerto naranjo amargo o agrio (*Citrus aurantium*), debido a su tolerancia a este patógeno (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

El virus de la tristeza de los cítricos (Citrus tristeza virus, CTV), pertenece al género Closterovirus, familia Closteroviridae (Bar-Joseph *et al.*, 1979, Bar-Joseph & Lee, 1989; Martelli *et al.*, 2000). Tienen viriones de morfología filamentosa (12 x 800-2000 nm), genomas formados por una, dos o tres moléculas de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva, que encapsidan separadamente, y al menos dos proteínas de cápside (CP y CPm), que se ensamblan formando una estructura helicoidal. Una de ellas (CP) cubre la mayor parte del RNA genómico, mientras que la otra cubre un segmento reducido del extremo 5' terminal, lo que da al virión una morfología similar a una serpiente de cascabel (Boyko *et al.*, 1992; Agranovsky, 1996; Febres *et al.*, 1996).

El vector más eficiente de la enfermedad es el áfido *Toxoptera citricida* (Brunt *et al.*, 1997), elemento que desencadena con su disseminación la alta mortalidad de plantas. Ha sido reportado en varios países de Centro América, en migración hacia el Norte, así como en las islas del Caribe incluyendo a Cuba. Desde noviembre de 1995 se le ha detectado también en el estado de la Florida y en octubre de 1996 llegó a Belice (De la Osa, 1998).

Las enfermedades de los agrios producidas por virus, viroides, micoplasmas y otros organismos similares producen importantísimas pérdidas económicas en todo el mundo. Algunas enfermedades provocan la muerte comercial de los árboles y las otras producen una disminución de la producción del 10 al 20%, baja calidad del fruto, pérdida de vigor y longevidad de los árboles y en muchos casos impiden la utilización del patrón más adecuado a cada huerto (Navarro, 1977).

Debido a que los cítricos se propagan en forma vegetativa, estas enfermedades se han difundido ampliamente, produciendo importantes pérdidas económicas en todas las regiones productoras del mundo. Para hacer frente a esta problemática, los países de citricultura avanzada como Estados Unidos, España y Sudáfrica han implementado, por medio de sus organismos técnicos, programas de certificación de material de propagación libre de virus (Figuerola *et al.*, 2000).

Los programas de certificación de cítricos, diseñados para garantizar que se lleven al campo plantas sanas de alto potencial genético, son el pilar fundamental de un programa de manejo integrado de plagas. Estos programas se iniciaron con el descubrimiento de que las enfermedades eran transmisibles por injerto y han evolucionado hasta llegar a controlar tales enfermedades, como la tristeza y la *clorosis variegada* que poseen vectores como medios de disseminación además de ser transmisibles por injerto (Lee, 2008).

Los cítricos son plantas de clima templado. En estado adulto están formadas normalmente por un tronco único que se ramifica profusamente a una altura de unos 60-80 cm, y forma una copa redondeada y tupida, de hojas persistentes. Su tamaño depende de la propia variedad, del patrón y de las condiciones edafoclimáticas, y por lo general oscila entre los 3 y 7 m de altura. La vida económicamente útil se cifra en unos 30-40 años, si bien hay árboles con más de 100 (Zaragoza, 2007).

Los cítricos pertenecen al orden geraniales, a la familia de las Rutáceas, subfamilia Aurantioideae, tribu Citrae y subtribu Citrinae. Las especies comerciales de cítricos usadas como injerto o portainjerto pertenecen al género *Citrus*, a excepción de *Fortunella sp.* (kumquats) y naranjo trifoliado (*Poncirus trifoliata*). La mayoría de los cítricos son especies nativas de las regiones tropicales y subtropicales del sur este de Asia y del archipiélago malayo (Varela *et al.*, 2013).

Tangelo minneola se originó en 1931 mediante el cruzamiento de *Citrus paradisi* “pomelo duncan” y *Citrus reticulata* “mandarina dancy” obtenido por W.T. Swingle, T.R. Robinson y E.M. Savage en Florida, USA. El árbol es muy vigoroso y adquiere gran tamaño, necesitando amplios espacios para su buen desarrollo. Es menos resistente al frío que su variedad hermana el *Tangelo orlando*, y de madurez más tardía, finales de agosto. El fruto de gran tamaño ha heredado de sus progenitores la forma redonda y con un pronunciado cuello característico. La corteza presenta una coloración naranja-rojiza extraordinaria, es muy delgada y lisa, resultando fácil de pelar. El sabor de la fruta es único, delicioso y característico de mandarina dancy, ácido y aromático como pomelo duncan (González, 2001).

Citrus limon var. *eureka* “limonero eureka” es una especie cultivar del limón obtenido en California por Thomas Garey en 1858, fue obtenida a partir de una siembra de semillas de limones importados de Italia, posiblemente del limón lunario. Años más tarde Thomas Garey, viverista de Los Ángeles hizo una selección de estas plantas, quien las introdujo al mercado con el nombre de “Garey’s eureka” (González, 2001).

El patrón ejerce una influencia vital en la producción y comportamiento de los cítricos. Las ventajas que se obtienen con la utilización de un patrón adecuado son múltiples, entre ellas se pueden mencionar las siguientes: una mejor adaptabilidad a diferentes condiciones de suelo y clima; mayor uniformidad en calidad de fruto y época de producción; es posible obtener plantas más pequeñas y que producen más pronto que aquellas no injertadas; es factible la obtención de combinaciones resistentes o tolerantes a enfermedades fungosas,

nemátodos o virales; finalmente ofrece la posibilidad de utilizar material de injertación certificado libre de virus (Ezequiel, 2004)

En la mayoría de las áreas citrícolas del mundo las enfermedades transmisibles por injerto producen importantes daños económicos, causando decaimientos, pérdida de vigor y reducción de la vida comercial de los árboles, bajas producciones, frutas de mala calidad y restringen el uso de muchos patrones con excelentes cualidades agronómicas. Según Hernández (1996) en patología de cítricos se han descrito más de 50 enfermedades, dentro de las que se encuentran la tristeza, la clorosis variegada y la cancrrosis; algunas de las cuales tienen efectos catastróficos, ya que pueden causar la muerte de los árboles y en muchas áreas representan la principal limitación para el desarrollo de la citricultura (Sociedad Española de Fitopatología, 2000).

Dentro de los métodos utilizados para la detección del virus, se encuentran el diagnóstico biológico con plantas indicadoras, la microscopía óptica y electrónica, técnicas moleculares como la RT-PCR e hibridación y técnicas inmunoenzimáticas. Estas últimas, en sus variantes de ELISA DAS (Sandwich de doble anticuerpo), DASI (Sandwich de doble anticuerpo indirecto) e Inmunoimpresión, resultan las de mayor aplicación en programas de certificación y prospecciones por su sencillez, bajo costo y capacidad de analizar grandes volúmenes de muestras en corto tiempo. Para la selección del procedimiento de diagnóstico a utilizar es necesario tener en cuenta la velocidad a la que se necesitan los resultados, la exactitud y sensibilidad requeridas, costo, disponibilidad de reactivos específicos, así como la disponibilidad de instalaciones y de personal entrenado (Peña *et al.*, 2008).

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas en las cuales se utiliza cualquier parte de la planta ya sean tejidos u órganos, en medios de cultivo específicos químicamente definidos, en condiciones controladas *in vitro* y por consecuencia libres de microorganismos (Calva & Ríos, 1999); esta técnica está basada en el principio de totipotencia, en donde se establece que una sola célula vegetal contiene el mismo material genético de la planta donadora (Ferl & Paul, 2000).

Dentro de las aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales tenemos el saneamiento de plantas, propagación clonal masiva, conservación de germoplasma, producción de metabolitos secundarios, obtención de nuevas variedades, así como la ingeniería genética (Roca & Ramírez, 2000).

El cultivo *in vitro* de ápices caulinares (meristemo apical con uno o dos primordios foliares), ha sido empleado para la obtención de plantas genéticamente más efectivas, así como para la producción en masa de plantas con la sanidad vegetal obtenida. Las principales aplicaciones del microinjerto son: obtención de plantas libres de virus, importación de plantas por procedimientos de cuarentena; separación de virus en infecciones mezcladas, y estudios sobre incompatibilidad en el injerto (Navarro, 1988).

Los meristemos son conjuntos de células indiferenciadas que se están reproduciendo continuamente por mitosis y permiten que la planta crezca en tamaño ya sea hacia arriba (ápice caulinar) o hacia abajo (ápice radicular) o en grosor. Por ser un tejido nuevo en la planta no alcanzan a desarrollar haces vasculares o de conducción, lo que impide que patógenos como los virus, viroides y otros patógenos vasculares como por ejemplo *Fusarium sp.*, no alcancen estas células, lo que garantiza que si se utilizan como explantes para cultivo *in vitro* se obtengan tejidos o plántulas sanas (Caro *et al.*, 2004).

La microinjertación *in vitro* de ápices caulinares constituye la mejor alternativa para la obtención de plantas de cítricos, de gran valor agronómico, libres de virus de difícil eliminación por las técnicas convencionales. Consiste en el desarrollo de un meristemo apical o explante colocado sobre el epicótilo decapitado de una planta originada a partir de semilla. El éxito del procedimiento obedece a que la tasa de multiplicación celular en el meristemo apical supera la del virus, escapando de la infección (Navarro *et al.*, 1977).

Según Monteverde *et al.* (1987), obtuvieron plantas de cítricos libres de psorosis y exocortis de árboles infectados a través de la microinjertación de ápices caulinares *in vitro*, al utilizar varetas de *Citrus sinensis* enfermos, los cuales fueron seleccionados por la producción y la calidad de la fruta. Los microinjertos se realizaron sobre portainjertos de *Citrang troyer*, fueron sembrados en medio MS Basal suplementado con 75 gr/l de sacarosa, incubándose en cámara de crecimiento a 25 °C con 16 hrs de iluminación. Navarro (1992), menciona que dicha técnica es un método para realizar el saneamiento el cual permite el intercambio de germoplasma en cítricos.

Según Chae *et al.* (2013), aplicaron la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* en combinación con la termoterapia para eliminar el virus de la tristeza de los cítricos, como portainjerto utilizaron *Poncirus trifoliata*. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10 %, por 10 min, sembrándose en medio MS. El pH del medio fue ajustado a 5.7, para posteriormente ser esterilizado a 121 C, por 15 min. Las semillas fueron incubadas a 27°C, en condiciones de oscuridad, por un lapso de dos semanas. Los microinjertos de

naranja, limón, mandarina, kumquart, fueron cultivados en medio MS sin agar, con una concentración del 7 % de sacarosa. Las condiciones de incubación fueron a una temperatura de 27 °C, a 16 hrs luz.

Según Godoy *et al.* (2013), lograron obtener plantas de *Citrus sinensis* libres de virus a través del uso de la termoterapia y microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Como explantes utilizaron varetas de árboles establecidos en campo que presentaban síntomas de la enfermedad, así como varetas de cítricos de árboles establecidos en invernadero con síntomas similares. Utilizaron como portainjerto *Citrangue troyer*, colocando un ápice conformado por dos o tres primordios foliares y el domo meristemático; realizando una incisión de T invertida en el portainjerto. Sembraron en tubos de ensayo, los cuales contenían medio de cultivo MS líquido + 100 mg/l de inositol + 0.2 mg/l de clorhidrato de tiamina + 1.0 mg /l de clorhidrato de piridoxina + 1.0 mg/l de ácido nicotínico y 70 gr/l de sacarosa, ajustando el pH a 5.7. Las plantas microinjetadas fueron mantenidas en iluminación de 1000 luxes, durante 16 horas al día, a una temperatura de 25 °C.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de la microinjertación de ápices caulinares *in vitro* para el saneamiento del “virus de la tristeza de cítricos” (CTV) en las variedades *Tangelo minneola* “tangelo” y *Citrus limon* var. *eureka* “limón”.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Localización del estudio.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) ubicado en el distrito de la Molina, provincia de Lima, departamento de Lima.

2.2 Zona de recolección de muestras de material vegetal (varetas).

La colecta de muestra se realizó en los campos citrícolas de la Estación Experimental Agraria Donoso, ubicado en el km 5.6 de la carretera Huaral-Chancay, departamento de Lima.

2.3 Material vegetal experimental.

2.3.1 Semillas certificadas

Se utilizó semillas de *Citrange troyer* (patrón trifoliado) como patrón para el microinjerto

Se utilizó semillas de *Citrus jambhiri* “limón rugoso” como patrón para el sobreinjerto en invernadero

2.3.2 Varetas

Se recolectó varetas de *Tangelo minneola* “tangelo” y *Citrus limon* variedad *eureka* “limón” del campo de la Estación Experimental Agraria Donoso- Huaral del INIA.

2.4 Métodos

2.4.1 Germinación aséptica del patrón.

Se procedió a extraer el tegumento de la semilla con una pinza de disección de 10,5 cm, las semillas sin tegumento se colocó en una placa Petri provista dentro de ella papel toalla estéril, gasa y con agua destilada estéril (Fig. 1), se hizo grupos de 10 semillas envueltas en trozos de gasa, se desinfectaron en tubos de ensayo estériles por inmersión en alcohol de 70° por un minuto, luego se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio al 4% a la que se añadió 0,1% de Tween 20 durante 5 minutos. Posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se sembraron en tubos de ensayo conteniendo el medio de germinación en solución de sales de Murashige y Skoog (1962) (tabla 1), a pH 5,7±0,1 solidificada con 7

gr/l de agar. La siembra de semilla se realizó en tubo de ensayo de 25x150, se incubó en el fitotrón a 27°C, 70 % de humedad y oscuridad hasta que alcancen un tamaño adecuado para ser injertados (2 a 3 semanas). Las plántulas resultantes se utilizaron como patrones (Fig. 2).

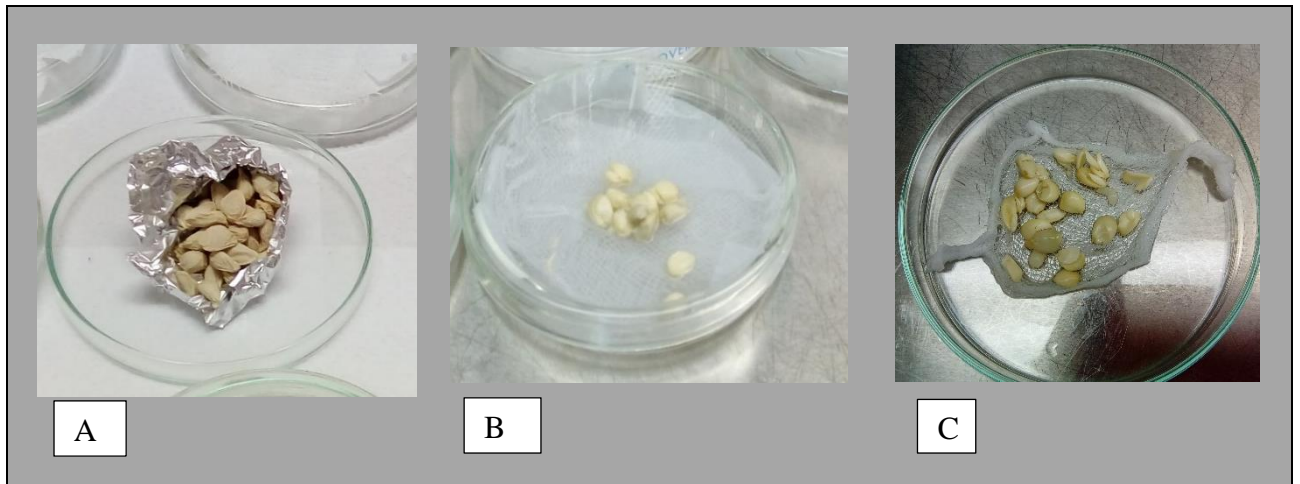


Figura 1. Preparación de semillas. A) Semilla de *Citrance troyer* salidas de cuarentena, B) semilla de *Citrance troyer* con los tegumentos eliminados, C) Semillas de *Citrance troyer* desinfectadas, aptas para ser sembradas



Figura 2. Germinación de semillas. A) Semilla de *Citrance troyer* sembrada, B) plántula resultante de 2 semanas de cultivo.

2.4.2 Preparación del injerto.

2.4.2.1 Acondicionamiento de varetas.

Las varetas se recolectaron del campo de la Estación Experimental Agrícola Donoso- Huaral del INIA. Para la recolección de varetas se utilizó una tijera podadora, la cual previamente se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10%, se cortó varetas de un tamaño aproximado de 20cm, se guardó en bolsas de papel kraf y se trasladó al laboratorio para su respectiva desinfección.

Las varetas llegadas a laboratorio se cepillaron con cepillo de dientes marca Colgate, con detergente marca Opal y agua corriente se hizo el cepillado minucioso hasta que la vareta quede libre de suciedad que trae de campo, posteriormente se enjuagó con abundante agua corriente, se realizó corte en los extremos de la vareta, pedúnculo y espinas con tijera podadora previamente sumergida al 10 % de hipoclorito de sodio, luego se sumergió en Benomyl (2gr/l) durante 1 hora. Las varetas fueron acondicionadas en papel Kraft, se envolvió y guardó en bolsas de polipropileno debidamente etiquetado por 2-3 semanas a temperatura de 4 °C.

2.4.2.2 Introducción *in vitro* de varetas.

Las varetas se colocaron en frascos estériles y se sumergieron en alcohol de 70° por 1 minuto, luego se remojaron en NaClO al 25 % y se adiciono 2 gotas de Tween 20 durante 20 minutos, se enjuagó 3 veces con agua destilada estéril, y se secaron en placas Petri de 15 x 200 mm por 30 minutos; se sembró las varetas en tubos de ensayo de 25x200 mm , la incubación y termoterapia fue en el fitotrón a 32°C, 70% de humedad y fotoperiodo 16 horas luz, durante 2-3 semanas. Los brotes obtenidos de las varetas cultivadas *in vitro* se utilizaron como fuente de ápices caulinares (Fig. 3). El medio utilizado fue la solución de sales de Murashige y Skoog (1962) (tabla 1) suplementado con vitaminas de White (Navarro *et al*, 1975) (tabla 2), solidificada con 7 g/l de agar. El pH del medio se ajustó a 5,7±0,1. El medio se distribuyó en partes alícuotas de 15 ml. en tubos de ensayo de 25x200 mm, se taparon con papel aluminio. El medio se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 minutos.



Figura 3. Brotes cultivados *in vitro*. A) Vareta cultivada *in vitro* con brotes de 3 semanas, B) Brote cultivado *in vitro* mostrando su tamaño ideal para microinjertación.

2.4.3 Microinjertación.

La plántula patrón se extrajo del tubo de ensayo y se decapitó dejando aproximadamente 4-5 cm del epicótilo, se cortó la raíz dejando de 2-3 cm sin dejar raíces secundarias (Fig. 4) y se dejó el número de cotiledones de acuerdo al tratamiento (0 cotiledón , 1 cotiledón, 2 cotiledones),luego se hizo la incisión T invertida con dimensiones de 1 mm en el extremo del epicótilo decapitado y un corte horizontal de 1-2 mm de anchura a través de la corteza hasta el cambium, con cuidado de no dañar la médula.

Con el empleo de instrumentos de microdisección, se aisló el ápice caulinar menor de 0,2 mm compuesto por el domo con dos primordios foliares, se colocó en la superficie de corte basal en contacto con la superficie cortical horizontal de la incisión T invertida practicada en el patrón. El patrón microinjertado se colocó en un tubo de ensayo con contenido de 10 ml de medio MS líquido de Murashige y Skoog (1962)(tabla 1) suplementado con vitaminas de White (Navarro *et al.*, 1975) (tabla 2), con variaciones de concentración de sacarosa de

30 gr/l (0.30% p/v) y 75 gr/l (0.75%p/v), previamente en el medio líquido se colocó un papel filtro doblado de soporte, al que se practicó un orificio, en el que se introdujo la raíz que estará inmersa en el medio de cultivo. Se llevó a incubación en fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 27°C. Se observó cada 15 días el prendimiento del microinjerto.



Figura 4. Material vegetal para la microinjertación. A) Patrón *Citrangue troyer* B) Brote como fuente de ápice caulinar de *Citrus limon* variedad *eureka* “limón”.

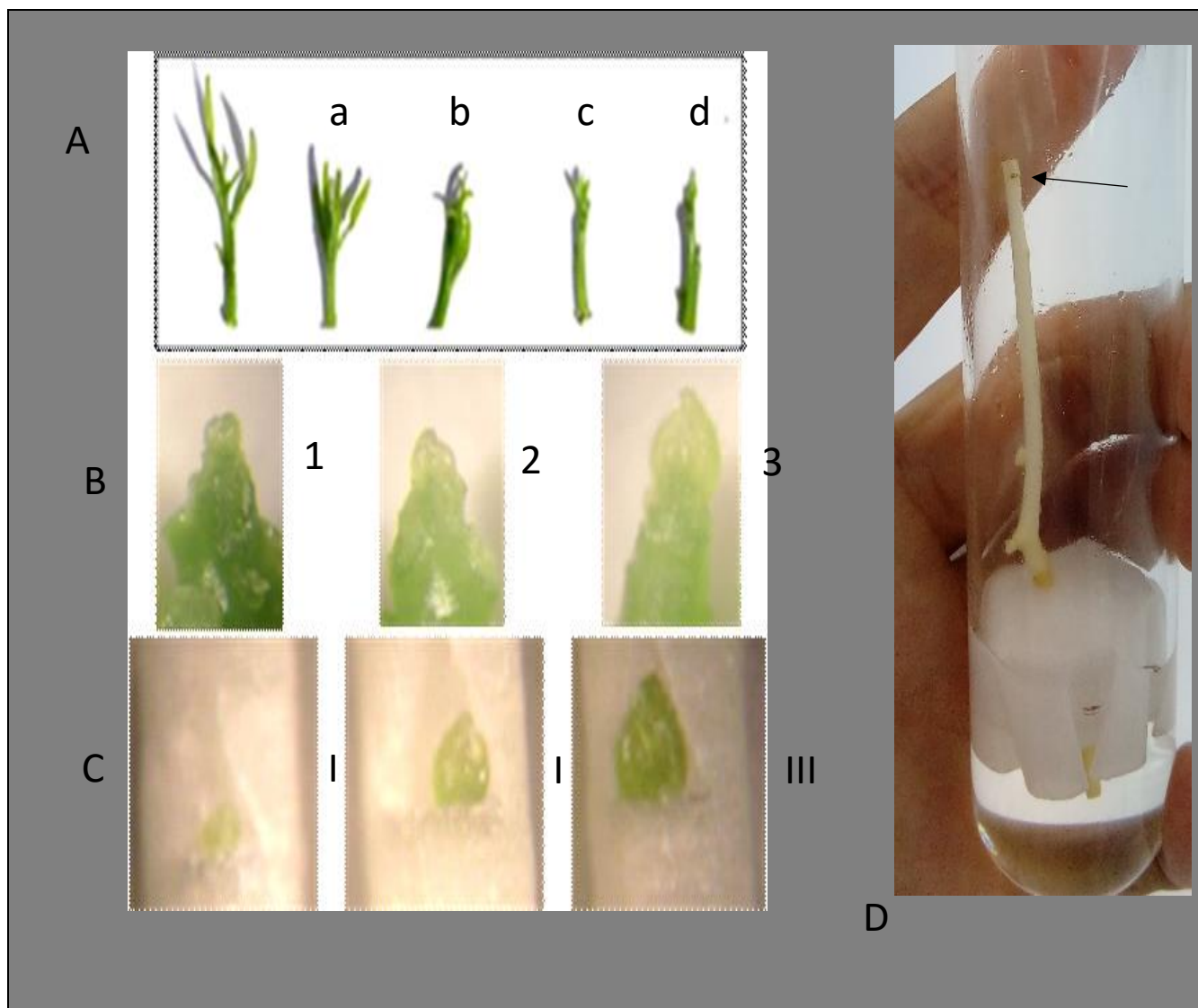


Figura 5. Disección del ápice caulinar. A) a) meristemo de 7 primordios foliares, b) meristemo de 6 primordios foliares, c) meristemo de 5 primordios foliares, d) meristemo de 4 primordios foliares. B) 1,2 y 3 meristemo de 4 primordios foliares en diferentes aumentos, C) I, II y III meristemo diseccionado de 2 primordios foliares, D) Microinjerto de ápice caulinar de *Citrus limon* var. *eureka* sobre el patrón *Citrang troyer* en medio liquido MS suplementado con vitaminas de White.

2.4.4 Sobreinjerto.

En la fase de sobreinjerto o reinjerto se utilizó como patrón *Citrus jambhiri* “limón rugoso” proveniente de la germinación en condiciones de invernadero, individualizadas y embolsadas de edad de 2-3 meses de desarrollo (figura 15).

Las plantas obtenidas por microinjerto se usaron como injerto.

Se realizó un injerto tipo cuña, para ello el patrón se podó al nivel de la yema apical y se realizó una incisión vertical, se extrajo el microinjerto del tubo de ensayo y se afino con ayuda de un bisturí haciendo una cuña debajo de la zona que anteriormente fue microinjertada. Ese trozo superior cortado, se colocó en la incisión del patrón limón rugoso y se ajustó con parafilm, luego se le colocó una bolsa plástica transparente en la parte apical de la planta microinjertada ajustándola para mantener la humedad, en el transcurso de la semana se hizo perforaciones a la bolsa con el objetivo de disminuir la humedad hasta el transcurso de 10 días, luego se retiró completamente la bolsa.

Se esperó que brote la planta sobreinjertada para la prueba molecular RT-PCR para virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

2.4.5 Diagnóstico molecular del virus de la tristeza de cítricos (CTV).

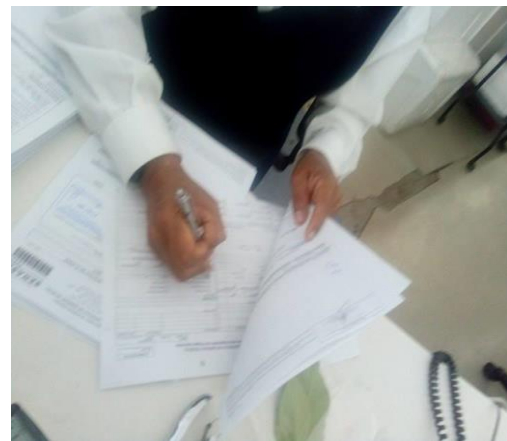
Se extrajo hojas de las plantas sobreinjertadas en invernadero, para ello se eligió al azar una planta de *Tangelo minneola* y dos de *Citrus limon* var. *eureka*; dos en limón porque en la primera extracción al azar se eligió a una planta que aparentemente no iba a satisfacer la cantidad de muestra requerida de 1 gramo, entonces se procedió a extraer otra planta al azar. Las hojas se colectaron en bolsas de polipropileno, se etiquetó y fue llevado al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) (figura 6) para el diagnóstico de virus de la tristeza de cítricos (CTV) mediante la prueba molecular RT-PCR. Las tres muestras fueron aceptadas para el diagnóstico de virus de la tristeza de cítricos (CTV).



Citrus limon variedad *eureka*



Tangelo minneola "Tangelo"



Recepción de muestras en SENASA

Figura 6. Muestras de *Tangelo minneola* "tangelo" y *Citrus limon* variedad *eureka* llevado al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) para el diagnóstico de virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

2.4.6 Procesamiento de datos

Se realizó el análisis de varianza (ANAVA) para cada uno de los factores con un nivel de significancia de 0.05 con el programa InfoStat, versión 2017.

Factor 1: concentración de sacarosa

Factor 2: número de cotiledones

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento y por cada repetición 10 unidades de microinjertos.

Los tratamientos fueron:

T₁: Medio MS + 30 g/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones

T₂: Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones

T₃: Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones

T₄: Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones

T₅: Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones

T₆: Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones

III. RESULTADOS

3.1 Resultados de presencia y ausencia de virus de la tristeza de cítricos (CTV).

La presencia o ausencia de virus de la tristeza de cítricos (CTV) se realizó mediante la prueba molecular RT-PCR. El resultado de las pruebas moleculares para la presencia del virus de la tristeza de cítricos (CTV) fue negativo en la muestra de *Tangelo minneola* “tangelo” y las dos muestras de *Citrus limon* var. *eureka* “limón” tal como lo informa el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) en sus informes emitidos (fig. 9, 10 y 11)

3.2 Resultados de prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo”

EL promedio de prendimiento de los microinjertos en los tratamientos fueron, T₁ (Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones) 13.3 %, T₂ (Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones) 10%, T₃(Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones) 3.3 % , T₄(Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones) 6.6%, T₅(Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones) 10%, T₆ (Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones) 3.3 % (tabla 3).

3.3 Resultados de prendimiento de los microinjertos de *Citrus limon* variedad *eureka* “limón”.

EL promedio de prendimiento de los microinjertos fueron, T₁ (Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones) fue 13.3 %, T₂ (Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones) 10%, T₃(Medio MS + 30 gr/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones) 3.3 % , T₄(Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 0 cotiledones) 6.6%, T₅(Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 1 cotiledones) 6.6%, T₆ (Medio MS + 75 gr/l de sacarosa, patrón con 2 cotiledones) 3.3 % (tabla 4).

3.4 Resultados de prendimiento de los sobreinjertos en invernadero.

El porcentaje de supervivencia de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo” y *Citrus limon* var. *eureka* sobre *Citrus jambhiri* “limón rugoso” fueron 100 % (tabla 5)

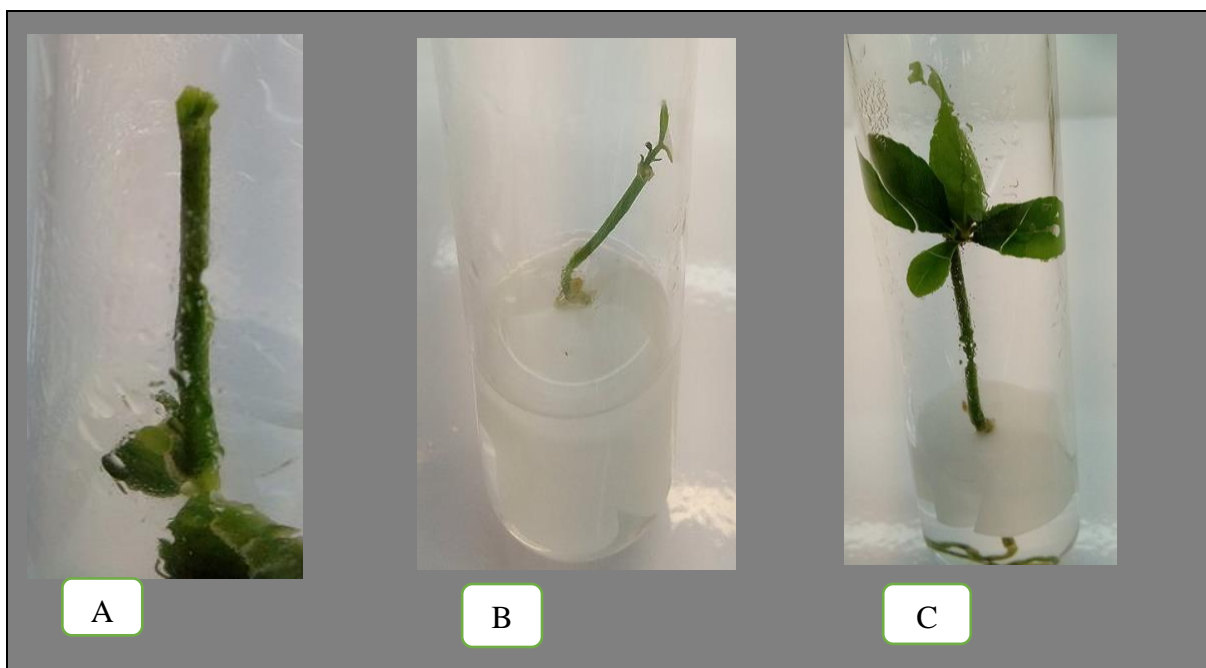


Figura 7. Etapas de desarrollo del microinjerto de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”. A) Microinjerto de 8-10 días, B) Microinjerto de 4 semanas, C) Microinjerto de 8 semanas.

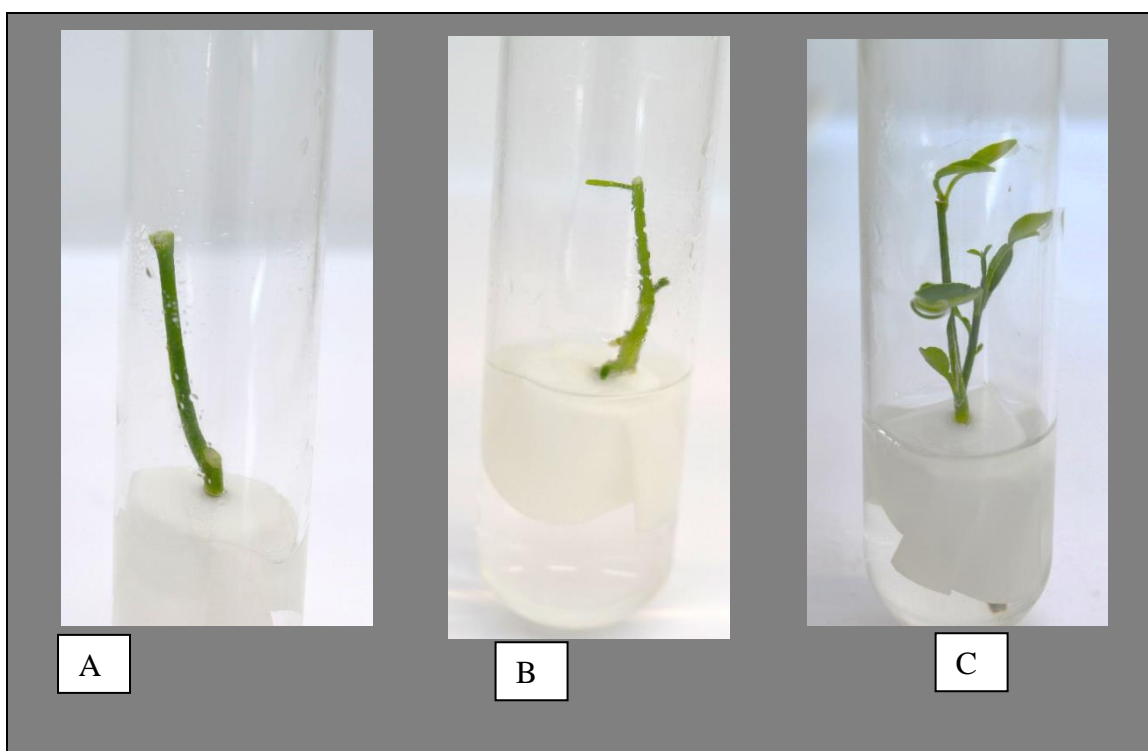


Figura 8. Etapas de desarrollo del microinjerto de *Tangelo minneola* “tangelo”. A) Microinjerto de 8-10 días, B) Microinjerto de 2 semanas, C) Microinjerto de 4 semanas

IV. DISCUSIÓN

De los 180 microinjertos, realizados a partir de brotes de varetas, se obtuvieron 14 plantas, obtenidas de tratamientos (T₁. 4, T₂. 3, T₃. 1, T₄. 2, T₅. 3, T₆. 1) en *Tangelo minneola* “tangelo” y 13 plantas (T₁. 4, T₂. 3, T₃. 1, T₄. 2, T₅. 2, T₆. 1) en *Citrus limon* var. *eureka* “limón”; esto significa un promedio general de prendimiento de 7.7 % para la primera y 7.2 % la segunda, utilizando ápices con dos primordios foliares. Navarro (1979), afirma que el número de ápices prendidos aumenta con el tamaño del ápice, pero la proporción de plantas libres de virus disminuye, al pasar de ápices con 2, a 4 o 5 primordios foliares. Navarro (1979), sugiere que, si queremos lograr sanear de virus al 100%, se debe utilizar el ápice con 2 primordios foliares como máximo. En la presente investigación el factor de ápice caulinar con 2 primordios foliares se mantuvo constante en los 180 microinjerto de cada variedad que se realizó, por lo que el informe de los test moleculares RT-PCR confirmaron que las plantas están libres de virus de la tristeza de los cítricos (CTV).

En la aplicación de la técnica de microinjerto para saneamiento de virus es importante considerar utilizar ápices con 2 primordios foliares para garantizar obtener plantas 100% libres de virus. Zamora *et al.* (2015) encontró que porcentajes de plantas libres de psorosis decrecieron de 100% a 50% cuando la talla del ápice se incrementó de 2pf a 4pf, mientras que para exocortis se redujeron de 100% a 88,9%. Con ápices de 6pf la reducción de la eficiencia fue de 45,8% para psorosis y 83,3% para exocortis. En este trabajo de investigación la finalidad fue sanear las plantas del virus de la tristeza de cítricos, por ello tomando en cuenta la aplicación de la técnica para sanear plantas de virus antes mencionado por Zamora, y considerando el papel clave de la utilización del tamaño del ápice, se utilizó ápices con 2 primordios foliares para sanear las plantas de virus de la tristeza de los cítricos.

La concentración de sacarosa que se utilizó en el medio nutritivo fue (30g/l y 75g/l), obteniendo un prendimiento relativamente bajo (tabla 3 y 4). Navarro *et al.* (1979) afirma que la concentración de sacarosa juega un papel importante en el desarrollo de los microinjertos, quienes obtuvieron el mayor número de injertos prendidos con una concentración de sacarosa en el medio de 7,5%. Al realizar el análisis estadístico de los datos de prendimiento, no hubo diferencias significativas entre utilizar la concentración de 30g/l o 75 g/l, ya que el porcentaje de prendimiento obtenido fue similar en las dos concentraciones.

Según Navarro *et al.* (1979) No se observaron diferencias en el grado de prendimiento y crecimiento entre patrones con cotiledones intactos o eliminados, sin embargo, cuando los cotiledones estaban presentes, sus yemas axilares brotaban vigorosamente y era necesario eliminar estos brotes, ya que aparentemente disminuyen el crecimiento de los ápices injertados. En la presente investigación no hubo diferencias significativas de prendimiento y crecimiento entre patrones con cotiledones intactos o eliminados, sin embargo, se observó que el patrón que conservó los cotiledones, sus yemas brotaron con vigorosidad (Fig. 12) disminuyendo el crecimiento del ápice injertado, coincidiendo con el estudio de Navarro.

Según Zamora *et al.* (2015) consideraron como prendidos aquellos ápices que se mantuvieron vivos y con color verde por un periodo mínimo de cuatro semanas, obtuvo 46,15% de prendimiento, el inicio del crecimiento de los ápices microinjertados fue perceptible a los ocho días en limero persa SRA-58. En esta investigación se consideraron como prendidos aquellos ápices que se mantuvieron vivos y con color verde por un periodo mínimo de 4 semanas, inicio del crecimiento de los ápices microinjertados de *Tangelo minneola* fue perceptible a los 7 días y en *Citrus limon* var. *eureka* a los 10 días.

Se menciona que la técnica del microinjerto fue propuesta por Murashige *et al.* (1972), pero puesta en práctica por Navarro *et al.* (1975). Dicha técnica consiste en la inducción del desarrollo de un meristemo apical, sobre el epicótilo de un portainjerto proveniente de una semilla germinada *in vitro*, cultivado bajo estrictas condiciones asépticas y establecidas en medios de cultivo apropiados. Además, mencionan que por medio de esta técnica es posible encontrar entre un 30 % y 50 % del éxito, en la eliminación de virus, viroides y en algunos casos reportando hasta el 90 %. En la presente investigación el prendimiento de los microinjertos fue relativamente bajo; en cuanto al saneamiento de virus de la tristeza la presencia fue negativo en *Tangelo minneola* y *Citrus limon* variedad *eureka*.

Por otra parte, cabe mencionar que en el proceso de la aplicación de la técnica de microinjerto, en la presente investigación se aplicó termoterapia a las varetas, la incubación y termoterapia de las varetas fue en el fitotrón a 32°C, 70% de humedad y fotoperiodo 16 horas luz, durante 2-3 semanas. Chae *et al.* (2013), utilizaron la técnica del microinjerto, en combinación con la termoterapia para eliminar el virus de la tristeza de los cítricos, obteniendo 100 % plantas libres de virus. Estos autores afirman que, para tener mayor seguridad en los programas de saneamiento, se debe combinar la técnica de microinjerto con la termoterapia, ya que esta disminuye la actividad metabólica de los patógenos dentro de la planta, dando lugar a microinjertar ápices completamente libre de patógenos.

Según Carvalho *et al* (2002), el tratamiento con calor o termoterapia es de suma importancia en la eliminación del virus, principalmente en los trabajos de introducción de plantas o partes de ellas a diferentes países. Esto refuerza las afirmaciones hechas por Roistacher (1977), al decir que la termoterapia debe ser utilizada en asociación con el microinjerto, como estrategia para mayor seguridad en los trabajos de limpieza clonal. En este trabajo se aplicó la técnica de microinjerto de ápices caulinares en asociación con la termoterapia aplicada a las varetas, a 32°C por 2-3 semanas.

Considerando todas las ventajas del microinjerto de ápices caulinares in vitro sobre otras vías para la obtención de material de propagación libre de patógenos, y teniendo en cuenta los importantes resultados que tanto en el saneamiento como en la introducción de variedades se han alcanzado en diversos países citrícolas, se recomienda el empleo de esta técnica como base de los programas de saneamiento dentro de los sistemas de producción de material de propagación certificado de cítricos que urge desarrollar en todos aquellos países donde la propagación aún no se realiza sobre la base de una garantía sanitaria (Mas, 1991). En el Perú no hay programas de saneamiento dentro de los sistemas de producción de material de propagación de cítricos que este certificado y garantice que esté libre de patógenos. La presente investigación es un aporte dentro del marco del proyecto de obtención de bloques fundación de plantas de cítricos libres de patógenos.

V. CONCLUSIONES

1. En el presente trabajo de investigación se concluye que la técnica de microinjertación de ápices caulinares *in vitro* influyó en el saneamiento del virus de la tristeza de cítricos (CTV) en *Tangelo minneola* “tangelo” y *Citrus limon* var. *eureka* “limón”, los resultados de las muestras analizadas por diagnóstico molecular (RT-PCR) para virus de la tristeza de cítricos (CTV) fueron negativos en las dos variedades, tal como lo informa el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) (*Tangelo minneola* “tangelo” (fig.9), *Citrus limon* var. *eureka* “limón” (fig.10 y 11)
2. No se halló diferencias significativas referente a la concentración de sacarosa de (30 gr/l) y (75 gr/l) en el prendimiento de los microinjertos de ápices caulinares *in vitro* en *Tangelo minneola* “tangelo” (cuadro 1 y 2; tabla 3), *Citrus limon* var. *eureka* “limón” (cuadro 6 y 7; tabla 4).
3. No se halló diferencias significativas referente al número de cotiledones en el prendimiento de los microinjertos en *Tangelo minneola* “tangelo” (cuadro 1 y 2; tabla 3), *Citrus limon* variedad *eureka* “limón” (cuadro 6 y 7; tabla 4), sin embargo, el patrón que conservaba los cotiledones, sus yemas brotaron con vigorosidad (fig.12) disminuyendo el crecimiento del ápice injertado.

VI. RECOMENDACIONES

1. Cultivar yemas *in vitro* cuando la variedad a injertar está en temporada de reposo.
2. Investigar la compatibilidad del patrón con la variedad a microinjertar.
3. Realizar la Microinjertación con patrones de 2 semanas de haber obtenido la germinación *in vitro* y las yemas de 2 a 3 semanas.
4. Las yemas que se injertarán deben manipularse cuidadosamente para disminuir el porcentaje de contaminación y oxidación del ápice aislado.
5. Utilizar patrones trifoliados para facilitar la identificación y desarrollo de la unión entre patrón-portainjerto y microinjertos.
6. En posteriores ensayos probar con concentración de sacarosa de 0 gr/l como control.
7. En posteriores ensayos eliminar los cotiledones del patrón.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agranovsky AA. (1996) Principles of molecular organization, expression and evolution of closterovirus: over the barriers. *Adv Virus Res* **17**: 119-158.
- Altman A. (2003). From plant tissue culture to biotechnology: Scientific revolutions, abiotic stress tolerance, and forestry. *In Vitro Cellular & Developmental Biology- Plant*. 39: 72- 75.
- Bar-Joseph, M. & Lee R. (1989). Citrus tristeza virus. Description of plant viruses. Commonwealth Mycological Instituto/Association of applied Biologists.
- Broadbent, P., Bevington, K.B., Coote. (1991). Control of stem pitting of grapefruits in Australia by mild strain protection. In: R.H. Brlansky, R.F. Lee, L.W. Timmer (eds.). Proceedings of the 11th Conference of International Organization of Citrus Virologists, IOCV, Riverside.
- Boyko, V.P; Karasev, A.V; Agranovsky, A.A; koonin, E.V; Dolja, V.V. (1992) Coat protein gene duplication in a filamentous RNA virus of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9156-9160.
- Calabrese F. (1992). The history of citrus in the Mediterranean countries and Europe. International Society of Citriculture.
- Calabrese F. (1998). La favolosa storia degli agrumi. L'EPOS Società Editrice. Palermo, Italia.
- Cambra & Moreno. (2000). Diagnóstico del virus de la tristeza (CTV) mediante la técnica Elisa: interés y aplicaciones. Levante Agrícola.
- Cambra & Moreno. (2000). Enfermedades de los cítricos. P. Moreno, N. Durán-Vila (eds.). Monografía de la Sociedad Española de Fitopatología N°2. Madrid. Ediciones Mundi-Prensa.

- Caro Marina *et al.* (2004) *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Instituto de Biotecnología U.N. Grupo Biosec. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Carvalho, s.; Santos, F.; Machado, M. 2002. Eliminação de virus do complexo sorose dos citros por microenxertia asociada a termoterapia. *Fitopatologia brasileira* (BR). 27 (3): 306 - 308.
- Curti-Diaz, S.A.; Loredó, R.X.; Díaz-Zorrilla, U.; Sandoval, J.A. Y Hernández, J. (1996). *Manual de Producción de Limón Persa*. (Tecnología de productores líderes para productores). INIFAP. Folleto No. 14.
- Chae, C.W., Yun, S.H., Park, J.H., Hyun, J.W., Koh, S.W. y Lee, D.H. (2013) Micrografting and Heat Treatment Combination for Eliminating Virus of CTV infected Citrus. *Journal of Life Science*, 23(2), 267-272
- De La Osa, F.J. (1998). Anteproyecto para el desarrollo de la fruticultura en el CIICA. Documento Interno. Tapachula, Chiapas. 10p.
- Del Castillo (2013). Perú espera incrementar sus exportaciones de cítricos en un 10% anual. Portal frutícola.
Recuperado de <http://www.portalfruticola.com/noticias/2013/03/11/peru-espera-incrementar-sus-exportaciones-de-citricos-en-un-10-anual/>
- Ezequiel (2004). “Evaluación de las técnicas de termoterapia y microinjerto in vitro de ápices meristemáticos de ‘limón pèrsico’ (*Citrus latifolia* bearss.), sobre diferentes portainjertos en el salvador”. Universidad de el Salvador.
- Fao (2013). Statistical Year book of the Food and Agricultural Organization for the United Nations.
- Fao (2015). Statistical Year book of the Food and Agricultural Organization for the United Nations
- Fao (2016). Statistical Year book of the Food and Agricultural Organization for the United Nations

- Ferl, R. y Paul, A.L. (2000). Genome organization and expression. En: *Buchanan B., Gruissem W., Jones R.* (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- Febres VJ, Ashoulin L, Mawassi M, Frank A, Bar-Joseph M, Manjunath KL, Lee R F, Niblett CL (1996) The p27 protein is present at one end of citrus tristeza virus particles. *Phytopathology* 86: 1331-1335
- Figuerola, J; Ramallo, J; Vinciguerra, H; Blanco, AS. (2000). Citrus: plantas libres de virus mediante la técnica de microinjerto de ápices caulinares. *Avance Agroindustrial*. 21 (4): 8-11
- Godoy, G.M., Romero, N.V; Segnana, L.G. (2013) Obtención de plantas de naranjo dulce *Citrus sinensis* (L.) Osbeck V. Folha murcha, libres del virus de la psorosis a través de termoterapia y microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. *Investigación Agraria*, 6(1), 15-19.
- Gonzales (2001). Mejoramiento Cítrico. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Asunción, Paraguay.
- Guerri, *et.al.* (2004). Seed transmission of Citrus leaf blotch virus: Implications in quarantine and certification programs. *Plant Disease* 88, 906 pp.
- Lee (2008). Programas de Certificación Para Cítricos, USDA ARS Riverside, CA, EE UU.
- Mas (1991) Saneamiento de Cítricos – Microinjerto de Ápices Caulinares *in vitro*, Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, La Habana, Cuba.
- Monteverde, E.E., García, M.L. y Briceño, M. (1987) Obtención de plantas cítricas libres de psorosis y exocortis en árboles infectados a través de la microinjertación de ápices *in vitro*. *Agron. Trop*, 36, 5-14.
- Murashige & Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473--497.

- Navarro, Roistacher y Murashige (1975). Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Journal of the American Society for Horticultural Science, 100(5), 471-479.
- Navarro (1977). Citrus virus diseases in Spain in relation to plant production: present and future prospects. Proc. Int. Soc. Citriculture 1: 136-140, 1977.
- Navarro *et. al.* (1979). Micro injerto de ápices caulinares *in vitro* para la Obtención de plantas de agrios libres de virus. Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. Centro de Levante, Moncada (Valencia).
- Navarro (1980). Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas de agrios libres de virus, Bol. Serv. Plagas., 5, 127-148.
- Nehra NS, Becwar MR, Rottmann WH, Pearson L. (2005). Invited review: forest biotechnology: innovative methods, emerging opportunities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 41: 701-717
- Navarro (1992) Citrus shoot tip grafting *in vitro*. in: High-Tech and Micropropagation II, Springer, pp. 327-338.
- Orozco, S.M. (1995). Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. UACH. 150p.
- Orozco, S.M. (1996). Enfermedades de los cítricos en México. Memorias sobre sistemas de producción de cítricos. Universidad Autónoma Chapingo, PIISCI, pp. 115-128.
- Roca, W. y Ramírez (2000). Introducción a la biotecnología vegetal. CEDAF.
- Sociedad Española de Fitopatología. (2000). Enfermedades de los cítricos Mundi- Prensa. Madrid, España. 165 p.
- Varela, F.S., Orosco, S.M., Torres, A.R. y Silva, A. (2013) Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos, (Ed.) UAT, pp. 428.

- Zaragoza S. (2007). Aproximación a la historia de los cítricos. Origen, dispersión y evolución de su uso y cultivo. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Producción Vegetal, Valencia, España.
- Zhang, G., Hong y Hong-hua (2010) Study on Pathogen-removal Shoot-tip Micrografting Technology of *Citrus medica* L. Research and Practice on Chinese Medicines, 2, 014.

VIII. ANEXOS

Tabla 1. Composición de la solución de sales minerales de Murashige y Skoog (1962).

Compuesto	concentración en el medio (mg/l)
Macronutrientes	
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1,650
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370
Fosfato de potasio (KH_2PO_4)	170
Nitrato de potasio (KNO_3)	1,900
Micronutrientes	
Ácido bórico (H_3BO_3)	6.2
Cloruro de cobalto ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato cúprico ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.8
Sulfato de manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.3
Yoduro de potasio (KI)	0.83
Molibdato de sodio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.25
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	8.6
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37.2

Tabla 2. Vitaminas de White (Navarro *et al*, 1975).

Vitaminas de White	(mg/l)
Tiamina.HCl	0.10
Piridoxina.HCl	0.50
Ácido nicotínico	0.50

Tabla 3. Datos de prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo”.

Tratamiento	Repetición	Concentración de sacarosa (gr/l)	Número de cotiledones	Número de microinjertos realizados	Número de microinjertos Prendidos	Prendimiento (%)	Promedio de prendimiento (%)
T ₁	R ₁	30	0	10	1	10	13.3
	R ₂	30	0	10	2	20	
	R ₃	30	0	10	1	10	
T ₂	R ₁	30	1	10	1	10	10
	R ₂	30	1	10	1	10	
	R ₃	30	1	10	1	10	
T ₃	R ₁	30	2	10	0	0	3.3
	R ₂	30	2	10	1	10	
	R ₃	30	2	10	0	0	
T ₄	R ₁	75	0	10	1	10	6.6
	R ₂	75	0	10	0	0	
	R ₃	75	0	10	1	10	
T ₅	R ₁	75	1	10	2	20	10
	R ₂	75	1	10	0	0	
	R ₃	75	1	10	1	10	
T ₆	R ₁	75	2	10	0	0	3.3
	R ₂	75	2	10	0	0	
	R ₃	75	2	10	1	10	
Total				180	14		

Tabla 4. Datos de prendimiento de los microinjertos de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”.

Tratamiento	Repetición	Concentración de sacarosa (gr/l)	Número de cotiledones	Número de microinjertos realizados	Número de microinjertos prendidos	Prendimiento (%)	Promedio de prendimiento (%)
T ₁	R ₁	30	0	10	0	0	13.3
	R ₂	30	0	10	1	10	
	R ₃	30	0	10	3	30	
T ₂	R ₁	30	1	10	2	20	10
	R ₂	30	1	10	0	0	
	R ₃	30	1	10	1	10	
T ₃	R ₁	30	2	10	0	0	3.3
	R ₂	30	2	10	1	10	
	R ₃	30	2	10	0	0	
T ₄	R ₁	75	0	10	1	10	6.6
	R ₂	75	0	10	0	0	
	R ₃	75	0	10	1	10	
T ₅	R ₁	75	1	10	0	0	6.6
	R ₂	75	1	10	1	10	
	R ₃	75	1	10	1	10	
T ₆	R ₁	75	2	10	0	0	3.3
	R ₂	75	2	10	0	0	
	R ₃	75	2	10	1	10	
Total				180	13		

Tabla 5. Datos de prendimiento de los microinjertos y sobreinjertos.

Variedad	Microinjertos		Sobreinjerto en invernadero en <i>Citrus jambhiri</i> Prendimiento (%)	Prueba molecular(RT-PCR) Presencia/ ausencia de virus de la tristeza de cítricos (CTV).
	Microinjertos prendidos / total	Prendidos (%)		
<i>Tangelo minneola</i> “tangelo”	14/180	7.7 %	100	(-)
<i>Citrus limon</i> var. <i>eureka</i> “limón”	13/180	7.2 %	100	(-)

Cuadro 1. Análisis de varianza de los datos de prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo”.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Prendimiento	18	0.34	0.07	80.18

Análisis de la Varianza						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	0.02	5	4.9E-03	1.26	0.3432	
Concentración de sacarosa	2.2E-03	1	2.2E-03	0.57	0.4643	
Número de cotiledones (Nc)	0.02	2	0.01	2.29	0.1442	
Concentración de sacarosa*Nc.	4.4E-03	2	2.2E-03	0.57	0.5794	
Error	0.05	12	3.9E-03			
Total	0.07	17				

Cuadro 2. Comparación de medias del prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo”.

Alfa=0.05 DMS=0.06405				
Error: 0.0039 gl: 12				
Concentración de sacarosa	Medias	n	E.E.	
75.00	0.07	9	0.02	A
30.00	0.09	9	0.02	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)				
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.09605				
Error: 0.0039 gl: 12				
Número de cotiledones	Medias	n	E.E.	
2.00	0.03	6	0.03	A
1.00	0.10	6	0.03	A
0.00	0.10	6	0.03	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)				

Cuadro 3. Prueba de normalidad de datos Shapiro-Wilks

Variable	n	Media	D.E.	W*	p (Unilateral D)
RDUO prendimiento	18	0.00	0.05	0.93	0.4505

Cuadro 4. Prueba de Levene para el factor concentración de sacarosa de los datos de prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo”

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS Prendimiento	18	0.13	0.08	74.06	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.		SC	gl	CM	F p-valor
Modelo.		2.2E-03	1	2.2E-03	2.44 0.1378
Concentración de sacarosa		2.2E-03	1	2.2E-03	2.44 0.1378
Error		0.01	16	9.1E-04	
Total		0.02	17		

Cuadro 5. Prueba de Levene para el factor número de cotiledones de los datos de prendimiento de los microinjertos de *Tangelo minneola* “tangelo”

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS Prendimiento	18	0.03	0.00	80.90	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.		SC	gl	CM	F p-valor
Modelo.		4.9E-04	2	2.5E-04	0.23 0.7994
Número de cotiledones		4.9E-04	2	2.5E-04	0.23 0.7994
Error		0.02	15	1.1E-03	
Total		0.02	17		

Cuadro 6. Análisis de varianza del prendimiento de los microinjertos de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”

Análisis de la varianza				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Prendimiento	18	0.20	0.00	122.11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	0.02	5	4.6E-03	0.59	0.7111	
Concentración de sacarosa	0.01	1	0.01	0.64	0.4383	
Número de cotiledones(Nc)		0.01	2	0.01	0.93	
0.4217						
Concentración de sacarosa*Nc.	3.3E-03	2	1.7E-03	0.21	0.8101	
Error	0.09	12	0.01			
Total	0.12	17				

Cuadro 7. Comparación de medias de prendimiento de los microinjerto de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”.

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.09058				
Error: 0.0078 gl: 12				
Concentración de sacarosa	Medias	n	E.E.	
75.00	0.06	9	0.03	A
30.00	0.09	9	0.03	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)				
Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.13584				
Error: 0.0078 gl: 12				
Número de cotiledones	Medias	n	E.E.	
2.00	0.03	6	0.04	A
1.00	0.08	6	0.04	A
0.00	0.10	6	0.04	A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)				

Cuadro 8. Prueba de normalidad de datos Shapiro-Wilks

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO Prendimiento	18	0.00	0.07	0.97	0.8595

Cuadro 9. Prueba de Levene para el factor concentración de sacarosa de los datos de prendimiento de los microinjertos de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS Prendimiento	18	0.13	0.08	68.25	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4.0E-03	1	4.0E-03	2.42	0.1397
Concentración de sacarosa	4.0E-03	1	4.0E-03	2.42	0.1397
Error	0.03	16	1.6E-03		
Total	0.03	17			

Cuadro 10. Prueba de Levene para el factor número de cotiledones de los datos de prendimiento de los microinjertos de *Citrus limon* var. *eureka* “limón”

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
RABS Prendimiento	18	0.11	0.00	71.15	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3.5E-03	2	1.7E-03	0.97	0.4008
Número de cotiledones	3.5E-03	2	1.7E-03	0.97	0.4008
Error	0.03	15	1.8E-03		
Total	0.03	17			

INFORME DE ENSAYO N° 108031 - 2017 - AG-SENASA-OCDP-UCDSV

1. Información del solicitante:		N° de Solicitud: 108080 - 2017
Nombre: TIRABANTE TERRONES NERY		
Dirección: MZ K LOTE 17 URB. APROVISA - LA MOLINA - LIMA - LIMA - La Molina / Lima / Lima		
N° Expediente:	Origen Material Vegetal: ..	
2. Información de la Actividad		
Servicio Externo		
3. Fecha de Recepción de la muestra:	Procedencia de la muestra:	Pais:
02/11/2017 08:59	La Molina / Lima / Lima	PERU
4. Cultivo:		
Nombre Científico: <i>Citrus x tangelo</i>		Cultivar: MINEOLA - M4 - TM
Nombre Común: Tangelo		

5. Resultado por Método de Ensayo:

VIROLOGIA Código Muestra: 201710840901000 Tipo: HOJA Cantidad: 5Unds

MET-UCDSV/BM-18 (DE 5 A 10 MUESTRAS) DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIRUS TRISTEZA CÍTRICOS (CTV) RT-PCR CONVENCIONAL

Fecha de Recepción : 02/11/2017

Fecha de Término: 08/11/2017

N°	Resultado	Información
1	Negativo a la presencia de	Citrus tristeza virus

N° de Informe



N° de Solicitud



6. Muestreo: No Aplica

7. Información adicional:

Lugar y Fecha:

La Molina, 09 de Noviembre del 2017



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO
 SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA
 OFICINA DE LOS CENTROS DE DIAGNÓSTICO Y PRODUCCIÓN
 Ing. Jorge Tanaka Nakamachio
 Director del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal

Nombre y Firma del Director (Sello oficial)

Consideraciones:

Los tiempos de duración del servicio están expresados en días hábiles y son contabilizados a partir de la fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio hasta la fecha de emisión del resultado.

Los tiempos de duración del servicio pueden aumentar de acuerdo a la cantidad de muestras que solicite procesar el usuario, en cuyo caso se concordará el plazo al momento de efectuarse el contrato.

REG-UCDSV-003 del PRO-UCDSV-003, vigente.

NOTA: El Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal sólo se responsabiliza por los resultados emitidos de la muestra indicada en el punto 4 del presente Informe.

Fecha y Hora: 21/11/2017 11:39

Figura 9. Informe de la prueba molecular RT-PCR para el virus de la tristeza de cítricos de *Tangelo minneola* “tangelo” emitido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)

INFORME DE ENSAYO N° 108028 - 2017 - AG-SENASA-OCDP-UCDSV

1. Información del solicitante:		N° de Solicitud: 108077 - 2017
Nombre: TIRABANTE TERRONES NERY		
Dirección: MZ K LOTE 17 URB. APROVISA - LA MOLINA - LIMA - LIMA - La Molina / Lima / Lima		
N° Expediente:	Origen Material Vegetal: ..	
2. Información de la Actividad		
Servicio Externo		
3. Fecha de Recepción de la muestra:		Procedencia de la muestra:
02/11/2017 08:48		La Molina / Lima / Lima
4. Cultivo:		País:
Nombre Científico: <i>Citrus limon</i>		PERU
Nombre Común: Limón		Cultivar: VARIEDAD EUREKA M1 - LE

Resultado por Método de Ensayo:

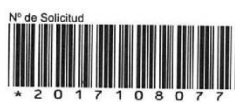
VIROLOGIA	Código Muestra: 201710840901000	Tipo: HOJA	Cantidad: 2Unds
------------------	--	-------------------	------------------------


MET-UCDSV/BM-18 (DE 5 A 10 MUESTRAS) DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIRUS TRISTEZA CÍTRICOS (CTV) RT-PCR CONVENCIONAL

Fecha de Recepción: 02/11/2017

Fecha de Término: 08/11/2017

N°	Resultado	Información
1	Negativo a la presencia de	Citrus tristeza virus



6. Muestreo: No Aplica	
7. Información adicional:	
Lugar y Fecha:	 MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA CENTRO DE DIAGNÓSTICO DE SANIDAD VEGETAL Ing. Jorge Yanaka Nakamacho Director del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal
La Molina, 09 de Noviembre del 2017	
Nombre y Firma del Director (Sello oficial)	


Consideraciones:

Los tiempos de duración del servicio están expresados en días hábiles y son contabilizados a partir de la fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio hasta la fecha de emisión del resultado
 Los tiempos de duración del servicio pueden aumentar de acuerdo a la cantidad de muestras que solicite procesar el usuario, en cuyo caso se concordará el plazo al momento de efectuarse el contrato

REG-UCDSV-003 del PRO-UCDSV-003, vigente.

NOTA: El Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal sólo se responsabiliza por los resultados emitidos de la muestra indicada en el punto 4 del presente Informe
 Fecha y Hora: 20/11/2017 16:18

Figura 10. Informe de la prueba molecular RT-PCR para el virus de la tristeza de cítricos de *Citrus limon* var. *eureka* "limón" emitido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)



MINISTERIO DE AGRICULTURA

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA
CENTRO DE DIAGNÓSTICO DE SANIDAD VEGETAL

Av. La Molina N° 1915, Lima 12 - Perú
 Teléfono directo: 313- 3303
 Central telefónica 313- 3300 Anexos: 1400 - 1401
 Pag. Web: www.senasa.gob.pe

Ministerio de Agricultura

SENASA
 Servicio Nacional de Sanidad Agraria
PERU

Pag. 1 de 1

INFORME DE ENSAYO N° 108029 - 2017 - AG-SENASA-OCDP-UCDSV

1. Información del solicitante: **N° de Solicitud: 108078 - 2017**
 Nombre: TIRABANTE TERRONES NERY
 Dirección: MZ K LOTE 17 URB. APROVISA - LA MOLINA - LIMA - LIMA - La Molina / Lima / Lima
 N° Expediente: **Origen Material Vegetal:** ..

2. Información de la Actividad
 Servicio Externo

3. Fecha de Recepción de la muestra: **Procedencia de la muestra:** **País:**
 02/11/2017 08:52 La Molina / Lima / Lima PERU

4. Cultivo:
 Nombre Científico: *Citrus limon*
 Nombre Común: Limón Cultivar: VARIEDAD EUREKA - M2 - LE

Resultado por Método de Ensayo:


VIROLOGIA **Código Muestra:** 201710840901000 **Tipo:** HOJA **Cantidad:** 6Unds

MET-UCDSV/BM-18 (DE 5 A 10 MUESTRAS) DIAGNÓSTICO MOLECULAR VIRUS TRISTEZA CÍTRICOS (CTV) RT-PCR CONVENCIONAL

Fecha de Recepción: 02/11/2017 **Fecha de Término:** 08/11/2017


N°	Resultado	Información
1	Negativo a la presencia de	Citrus tristeza virus

N° de Informe



* 2 0 1 7 1 0 8 0 2 9

N° de Solicitud




* 2 0 1 7 1 0 8 0 7 8

6. Muestreo: No Aplica

7. Información adicional:

Lugar y Fecha:
 La Molina, 09 de Noviembre del 2017



MINISTERIO DE AGRICULTURA Y RIEGO
 SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD AGRARIA
 PRESIDENTE DEL CENTRO DE DIAGNÓSTICO DE SANIDAD VEGETAL

[Firma]
 Ing. Jorge Yamaki Nakamachio
 Director del Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal

Nombre y Firma del Director (Sello oficial)

Consideraciones:
 Los tiempos de duración del servicio están expresados en días hábiles y son contabilizados a partir de la fecha de recepción de la muestra en el Laboratorio hasta la fecha de emisión del resultado.
 Los tiempos de duración del servicio pueden aumentar de acuerdo a la cantidad de muestras que solicite procesar el usuario, en cuyo caso se concordará el plazo al momento de efectuarse el contrato.
 REG-UCDSV-003 del PRO-UCDSV-003, vigente.

NOTA: El Centro de Diagnóstico de Sanidad Vegetal sólo se responsabiliza por los resultados emitidos de la muestra indicada en el punto 4 del presente Informe.

Fecha y Hora: 20/11/2017 16:19

Figura 11. Informe de la prueba molecular RT-PCR para el virus de la tristeza de cítricos de *Citrus limon* var. *eureka* “limón” emitido por el Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA)

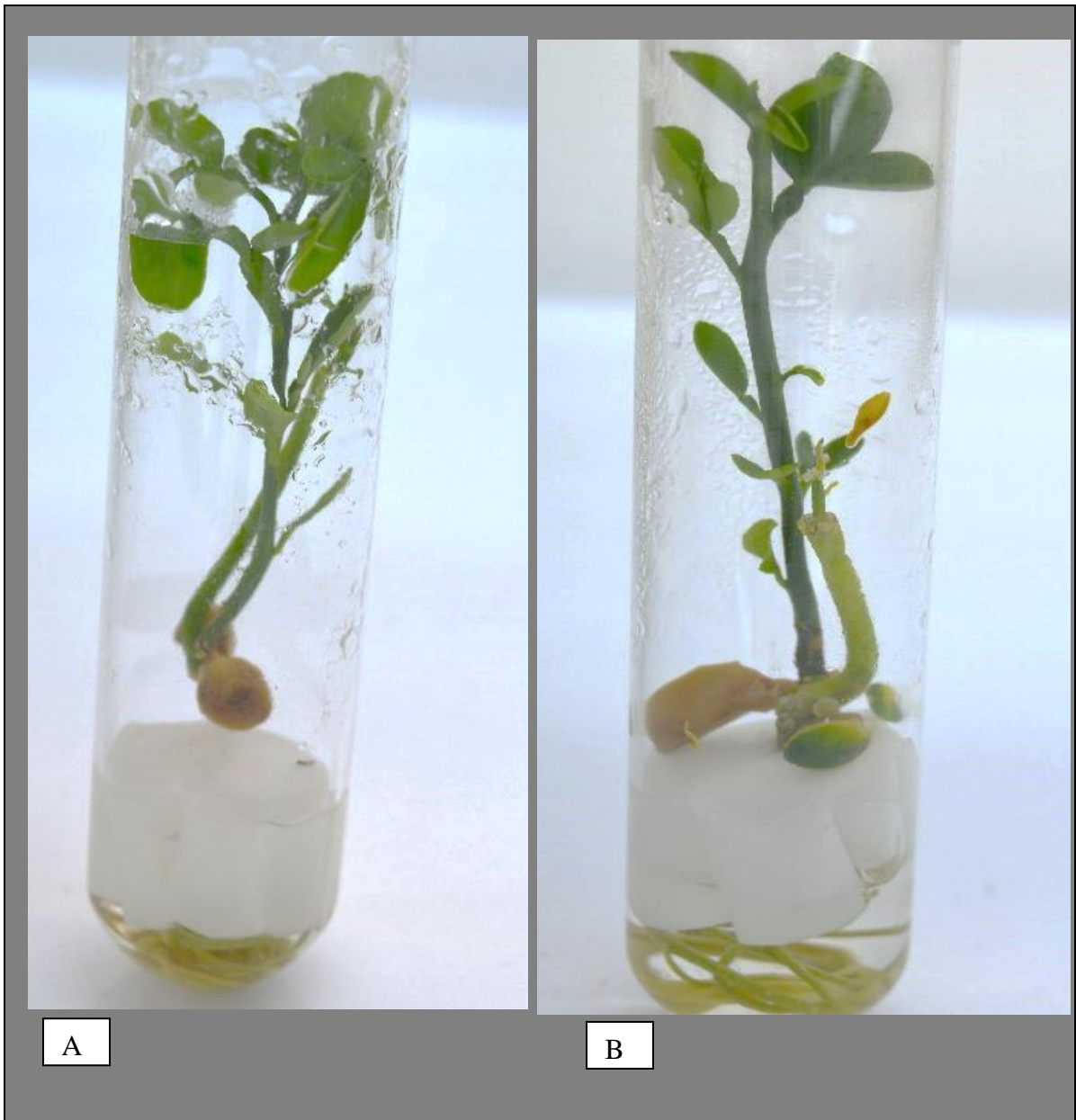


Figura 12. Microinjertos no prendidos. A) Microinjerto no prendido de *Citrus limon* var. *eureka* “limón” del tratamiento (75 g/l de sacarosa y 2 cotiledones), B) Microinjerto no prendido de *Tangelo minneola* “tangelo” del tratamiento (75 g/l de sacarosa y 2 cotiledones).

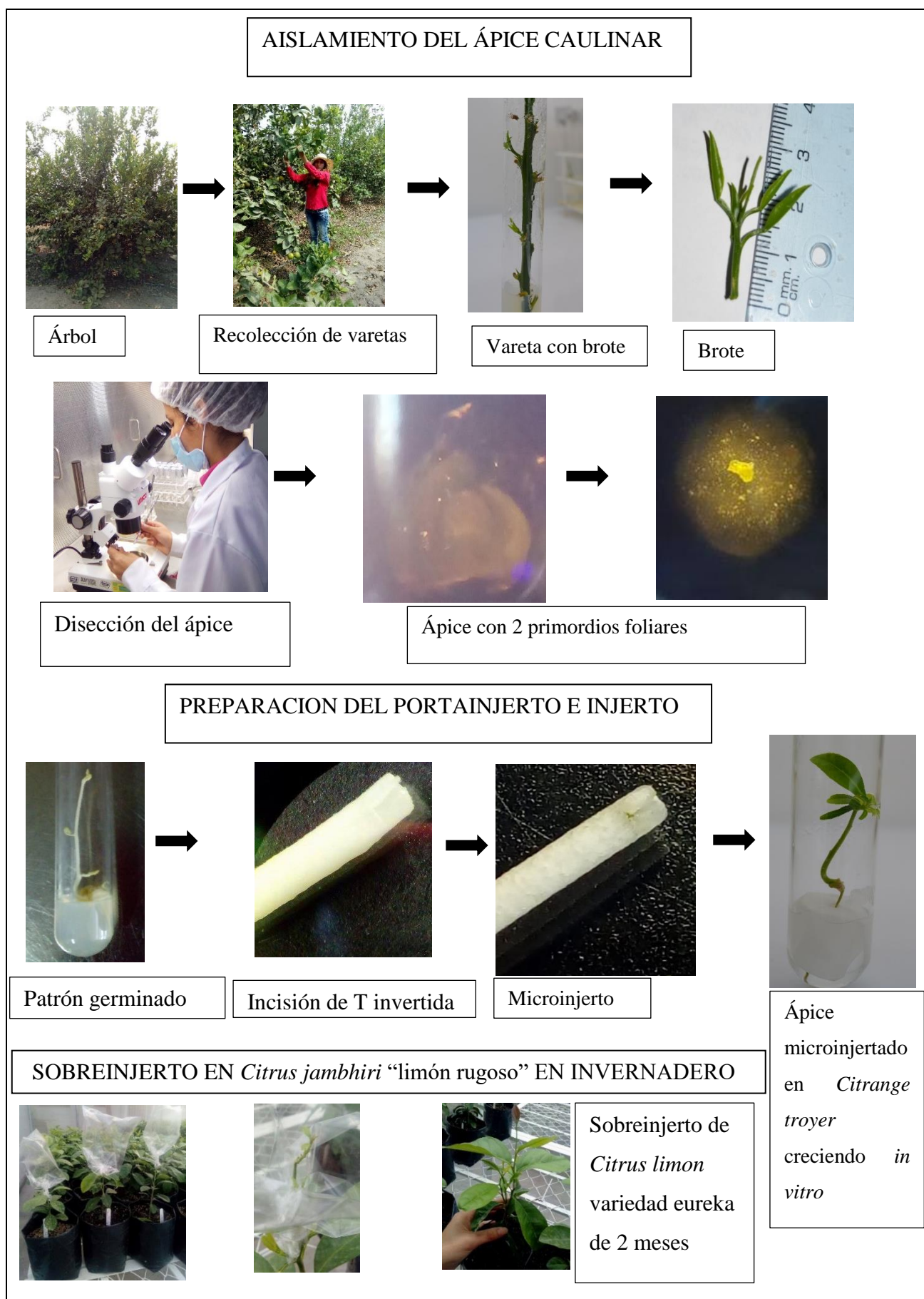
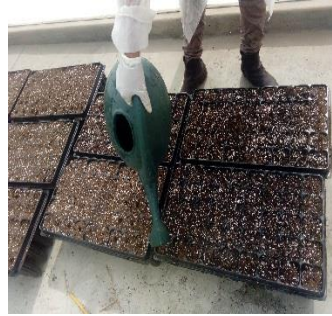


Figura 13. Esquema de la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro* (MAC)

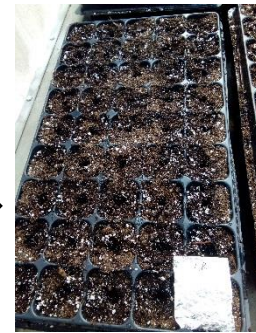
Siembra de patrón *Citrus jambhiri* “limón rugoso”



Sustrato premix # 8



Bandejas germinadoras de 110 mm de profundidad, 54.4x28.2 cm de 45 cavidades.



Siembra de semillas de *Citrus jambhiri*

Trasplante



Plantas germinadas de 8 semanas tienen de 2 a 3 pares de hojas



Extracción de la plántula de la cavidad de la bandeja



Trasplante a bolsas de 40 x 40 con sustrato premix #8



Patrón *Citrus jambhiri* aptos para sobreinjerto

Figura 14. Siembra de patrón *Citrus jambhiri* “limón rugoso”

Sobreinjerto de *Citrus limon* var. *eureka* y *Tangelo minneola* sobre *Citrus jambhiri* “limón rugoso”



Materiales:

Bisturí, pinza mediana, tijera, parafilm, H₂O destilada, H₂O dest. al 10% de hipoclorito de sodio, tijera de podar.



Se cortó por debajo del microinjerto realizado y se afinó tipo cuña



Microinjerto inserto en el patrón *Citrus jambhiri*.



Se ajustó con parafilm.



Se cubrió con bolsa para evitar que se deshidrate



Durante las 2 semanas siguientes se hizo pequeños orificios para que elimine el exceso de humedad y finalmente se retiró la bolsa

Sobreinjerto de *Citrus limon* variedad *eureka* de 2 meses



Figura 15. Esquema del procedimiento de sobreinjerto



Figura 16. Recolección de varetas de los campos de la Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral.



Figura 17. Campos citrícolas de la Estación Experimental Agraria Donoso - Huaral.



Figura 18. Acondicionamiento de varetas en el ambiente de recepción de muestra del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA).



Figura 19. Invernadero establecido para el proyecto: Establecimiento de bloques fundación de material de propagación de cítricos libres de virus, viroides y HBL, mediante la aplicación de técnicas biotecnológicas de saneamiento con fines de implementación de un programa nacional de certificación de cítricos liderado por PROCITRUS en asociación con el INIA.